

Method for producing cell wall skeleton powder by use of red nocardia

Patent number: CN1094288
Publication date: 1994-11-02
Inventor: JINJI HONG (CN); QINGBO WANG (CN); JUNYU CHEN (CN)
Applicant: FUJIAN PROV MICROORGANIC INST (CN)
Classification:
- international: A61K35/74; C12N1/20
- european:
Application number: CN19930104969 19930423
Priority number(s): CN19930104969 19930423

Report a data error here

Abstract of CN1094288

The invented method consists of the technologies of culturing mycelia using glucose and yeast paste as culture medium, mycelia preparation, cell breaking, proteinase processing, solvent extracting and vacuum drying. The test shows that the powder of cell wall skeleton made by said method has the functions of low toxic side effects, strong immunological activity, capable of inhibiting the growth of transplantation tumor cell and prolonging the life of patient of carcinoma of stomach or large intestine or osteosarcoma or melanoma.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

[19]中华人民共和国专利局

[11] 公开 1094288A



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 93104969.5

[51]Int.Cl⁵

A61K 35/74

[43]公开日 1994年11月2日

[22]申请日 93.4.23

[71]申请人 福建省微生物研究所

地址 350007福建省福州市仓山区进步路25号

[72]发明人 洪金基 王清波 陈君玉

张祝兰 陈必兴 肖征森

[74]专利代理机构 福建省专利服务中心

代理人 田志平

C12N 1/20

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 利用红色诺卡氏菌制造细胞壁骨架粉末的方法

[57]摘要

本发明是一种利用红色诺卡氏菌制造具有抗肿瘤活性的细胞壁骨架粉末的方法。该方法包括有以葡萄糖、酵母膏为培养基进行菌体培养、菌体制备以及细胞破碎、蛋白酶处理、溶媒提取、真空干燥处理工艺。由本发明方法制出的细胞壁骨架粉未经试验表明,毒副作用低、免疫活力强,能抑制移植性肿瘤生长,具有防止肿瘤复发和阻止肿瘤转移的功能,能延长胃癌、大肠癌、成骨肉瘤和黑色素瘤患者生命生存期。

(BJ)第 1456 号

将按本发明上述法制出的N-CWS干粉原料药按本藤制药公司的配方制成安瓿针剂成品，用于临床试验，其试验情况如下：

实施例2：

用于胃癌，其654例，其中用药组（手术+化疗+N-CWS）362例，对照组（手术+化疗）292例。生存率对照见表2。

（表2）

组 别 生存	用药组	对照组
一年生存率	90.73%	85.33%
三年生存率	61.54%	45.60%
五年生存率	47.06%	30.26%

三年生存率用药组较对照组提高16%（ $P < 0.05$ ），
五年生存率用药组较对照组提高17%，对根治性及非根治性病例，三年生存率用药组较对照组都有提高，且均有统计学意义。

免疫指标：中性粒细胞吞噬功能的测定，用药组比对照组吞噬指数有提高（ $P < 0.05$ ）；用药组的淋巴细胞转化由50%提高到61%（ $P < 0.05$ ）。

实施例3：

用于成骨肉瘤，其中：用药组（N-CWS+转移因子）为

32例，对照组（转因子）为11例，结果见表3：

（表3）	用药组	对照组
平均生存期（月）	24.8	10.5
三年存活率	>60%	/
转移时间 平均手术后（月）	14.8	5.6

实施例4：

用于淋巴瘤，其中：用药组（N-CWS+化疗）为30例，对照组（化疗）为22例，结果见表4：

（表4）	用药组	对照组
CR+PR	30	22
有效率	92.6%	77.3%

实施例5：

用于膀胱癌，用药组（手术+N-CWS）25例，对照组（手术+抗癌药物），其结果见表5：

(表5)	用药组	对照组
复发率	二年复发率9.0%	二年复发率14.5%

实施例6:

用于大肠癌, 大肠癌手术切除后分成免疫化疗组(治疗组) 114例和化疗组(对照组) 123例, 治疗组1、3、5年生存率分别提高13.0%、23.5%和22.7%, 差异具有显著意义 ($P < 0.05$), 见下表6:

(表6)

生存率	治疗组	对照组	P值
一 年	95.7%	82.5%	$P < 0.05$
三 年	86.36%	62.8%	$P < 0.05$
五 年	72.7%	50.0%	$P < 0.05$

权利要求书

1、一种利用红色诺卡氏菌（保藏号：CGMCC No. 0187）菌种，经培养基进行菌体培养与制备、菌体破碎、蛋白酶处理、溶媒提取、真空干燥处理制造具有抗肿瘤活性的红色诺卡氏菌体细胞壁骨架粉末（N-CWS）的方法，其特征在于：

所述的培养基包括种子培养基与扩大培养基，种子培养基与扩大培养基均为含：葡萄糖为0.5~2.0%、酵母膏0.5~2.0%、PH为5.5~7.5的培养基；

所述的菌体培养与制造是：在种子培养基中培养30~50小时，再将种子培养液以2~10%的接种量移种入扩大培养基中培养72~120小时，上述培养中采用200~240r/min旋转培养或采用振动培养，培养温度为28~37℃，随后扩大培养液经静置沉淀，经检查无菌后、收集、3000r/min的离心，弃去上清液、水洗、离心重复2~4次，得湿细胞体；

所述的菌体破碎是按1:4~8的量向湿细胞体中加入蒸馏水，采用超声波破碎处理至破碎率达80%以上，经2000~3000r/min离心，取上悬液用10000~20000r/min离心，弃去上清液，蒸馏水洗涤后弃上清液即得细胞壁碎片；

所述的蛋白酶处理是将细胞壁碎片经盐水、蒸馏水洗涤，离心后再进行胰糜蛋白酶处理和链霉蛋白酶处理，其中：

胰、糜蛋白酶处理为：按每克湿细胞的量加入无菌的含胰蛋白酶为0.1~0.2mg/ml、糜蛋白酶为0.1~0.2mg/ml、浓度为0.07M、PH为7.8的磷酸缓冲液4~8ml，并置于15~30℃进行搅拌消化处理24~48小

时,再经离心后再重上述胰、糜蛋白酶消化处理一次,离心;
用上述的磷酸缓冲液洗涤,离心,

链霉蛋白酶处理为:按每克湿细胞量加入无菌的含链霉蛋白酶为 $0.1 \sim 0.2 \text{ mg/ml}$ 、PH为7.2的三羟基氨基甲烷盐酸缓冲液 $4 \sim 8 \text{ ml}$,在 $15 \sim 30^\circ\text{C}$ 下进行搅拌消化处理 $24 \sim 48$ 小时,离心,再经上述的三羟基氨基甲烷盐酸缓冲液洗涤,再重复上述链霉蛋白酶消化处理一次,再分别经三羟基氨基甲烷盐酸缓冲液、盐水、蒸馏水洗涤、离心,

上述蛋白酶处理过程中各次离心均采用 $10000 \sim 20000 \text{ r/min}$;

所述的溶媒提取分别为:乙醇提取,乙醇与乙醚为1:1提取,吡啶提取,氯仿提取,苯提取,其中:溶媒用量按每克湿细胞量为 $0.5 \sim 2 \text{ ml}$ 的量加入,每步提取 $4 \sim 8$ 小时。

说明书

利用红色诺卡氏菌制造细胞壁骨架 粉末的方法

本发明涉及微生物制品，特别是关于利用由土壤中分离获得的培养特征、特性与红色诺卡氏菌 (*Nocardia Rubra*) 基本相同的诺卡氏菌株 (下称“红色诺卡氏菌 PO-8”) 作为生产菌株 (菌种) 来制造细胞壁骨架粉末 (N-CWS) 的方法。

红色诺卡氏菌与 BCG (卡介苗) 一样均属佐剂物质，其免疫活性因子存在于细胞壁骨架上，(Cell Wall Skeleton) —— 见《国外医学》免疫学分册 1981 年第 4 卷第 4 期 P 202 页周正任译。该菌的菌体经破碎、蛋白酶处理、溶媒提取后制得红色诺卡氏菌细胞壁骨架 (*Nocardia Rubra-Cell Wall Skeleton* 简称

“N-CWS”) 含有诺卡氏菌酸——多糖 (阿拉伯半乳聚糖) ——粘肽 (丙氨酸、谷氨酸、Meso——二氨基庚二酸，葡萄糖胺和胞壁酸等)。所制得的冻干 N-CWS 制剂对动物肿瘤有显著的抑制作用 (见《福建医学杂志》1983 年第 5 期 P 34 页; 《Nat'l. Cancer Inst》52、P 95、1974; 《Cann》69、P 619、1978)。经临床上试用结果证明其具有抑制肿瘤生长，能防止肿瘤复发和转移的功能，具有延长肺癌、胃癌、急性粒白血病及黑色素瘤患者的生存期的效果 (见《Kumamoto Med》36(1): 15 1983; 《Cancer Res.》43: 3001 1983;

28~37℃培养5~10天,置4℃保存得。

2、菌体培养与制造包括种子培养、扩大培养菌体收集、其中:

种子培养是将PO-8菌接种于种子培养基(即本发明所述的培养基)中,于28~37℃,并采用振动培养或200~240r/min的旋转培养30~50小时得种子培养液。

扩大培养(二级培养)是将种子培养液以2~10%的接种量移种入扩大培养基(即本发明所述的培养基)中,于28~37℃,并采用振动培养或200~240r/min的旋转培养72~120小时得扩大培养液。

菌体(细胞体)收集是将扩大培养液静置沉淀,经检查无菌后收集,以3000r/min的转速离心弃去上清液,水洗,并重复上述离心、水洗2~4次,将所到的湿细胞体置于低温(-20℃)保存。

3、菌体破碎处理:按1:4~8的量向湿细胞体中加入蒸馏水,使用超声波破碎机破碎处理至破碎率达80%以上,再经2000~3000r/min离心,将得的上悬液采用10000~20000r/min离心,弃去上清液,沉淀物经蒸馏水洗涤后弃上清液即得破碎的细胞壁沉淀物(即细胞壁碎片)。

4、蛋白酶处理:将破碎后的细胞壁沉淀物分别经盐水、蒸馏水洗涤,再采用10000~20000r/min离心后得干净的湿细胞壁碎片再进行以下蛋白酶处理以除去蛋白质,其中:

(1) 胰、糜蛋白酶处理:按每克湿细胞的量加入含胰蛋白酶为0.1~0.2mg/ml和糜蛋白酶为0.1~0.2mg/ml、PH为7.8的0.07M的无菌的磷酸缓冲液4

《Cancer Res.》43: 5575 1983 但是以现有的红色诺卡氏菌以及相应制备红色诺卡氏菌的细胞壁骨架粉（原料药）的工艺进行生产，存在培养基配方不合理，培养的产量低，加上在提取工艺中的提取之前需要冷冻干燥，故而造成工艺复杂、周期长，并且产量低，无法满足需求。

为此，本发明的目的在于寻求一株性能（特性）优良，并且具有与红色诺卡氏菌相同的特征的菌种，以及设计出高产的培养基和相应的培养、分离、酶处理、提取等工艺。

本发明的技术解决方案包括：菌种、培养基、菌体制造、菌体破碎处理、蛋白酶处理、溶媒提取、干燥后处理。现分别详述如下：

本发明所述的菌种是指从中国云南昆明的土壤中分离获得的一株诺卡氏菌，是一种经形态观察、培养、特征、生理生化特征观察和细胞壁成份的分析、鉴定，证实其特征基本上与红色诺卡氏菌相同，但对蔗糖利用上优于红色诺卡氏菌，且在马铃薯块生长菌落小而隆起，属于红色诺卡氏菌的变异种（以下简称

“PO-8菌株”，该PO-8菌株已于1993年1月11日送交中国北京的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏，保藏中心登记入册编号为：CGMCC NO: 0187）。

本发明所设计的培养基包括种子培养基与扩大培养基均为：葡萄糖0.5~2.0%、酵母膏0.5~2.0%、PH为5.5~7.5。

本发明所涉及的菌种（PO-8）、菌体培养与制造、菌体破碎处理、蛋白酶处理、溶媒提取、干燥后处理的工艺分别是：

1、菌种：将PO-8菌株接种在琼脂培养基斜面上，于

~8 ml, 在15~30℃下进行搅拌消化处理24~48小时, 经离心得到沉淀物后, 再重复加入上述含蛋白酶的磷酸缓冲液进行相同的消化处理, 随后再用上述的磷酸缓冲液洗涤、离心。

(2) 链霉蛋白酶处理是: 按每克湿细胞的量加入含链霉蛋白酶为0.1~0.2 mg/ml、PH为7.2的无菌的三羟基氨基甲烷盐酸(即Tris-HCl)缓冲液4~8 ml, 在15~30℃下进行搅拌消化处理24~48小时, 离心、Tris-HCl缓冲液洗涤, 再重复上述链霉蛋白酶消化处理一次, 分别用Tris-HCl缓冲液、盐水、蒸馏水洗涤、采用10000~20000 r/min进行离心。

5、溶媒提取: 对经蛋白酶处理过的细胞壁碎片先用无水酒精浸泡, 3000 r/min离心沉淀, 而后进行溶媒提取除去色素与脂类, 其提取步骤为: 第一步用乙醇; 第二步用乙醇与乙醚, 两者比例为1:1 (v/v); 第三步用吡啶; 第四步用氯仿; 第五步用苯; 溶媒用量为每克湿细胞壁碎片0.5~2 ml, 每步提取时间为4~8小时。

6、真空干燥处理是: 将经溶媒提取处理过的湿细胞壁碎片用甲醇、乙醚洗涤后, 经真空抽干至无溶媒气味, 研磨得白色的红色诺卡氏菌细胞壁骨架干粉末(N-CWS)。

由于本发明技术解决方案的实现, 获得了白色的质量好的N-CWS并有较高的产量, 与现有技术相比至少具有下述优点:

其一、本发明的培养基配方较现有公知的苏通

“Soutons”培养基优越。由本发明的培养基所产出的菌体量比现有的苏通培养基产出的菌体量高出1~3倍, 而且其细胞的破碎以及N-CWS的剂型制备更为容易。

其二、由于在提取工艺中省去了复杂的冷冻干燥工艺，调整了溶媒提取顺序和改变了提取方法，这不但节省了贵重的仪器及动力，还降低了成本，也使生产工艺缩短了约30%的时间。

其三、由本发明技术解决方案制成的N-CWS经免疫学、药效学和毒理学的研究证实：

(1) 试验表明：适宜量pHA+N-CWS ($7.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)，与对照组比较，淋巴细胞转化率提高到40% ($P < 0.001$)。小鼠腹腔注射N-CWS $3 \text{ mg}/\text{kg}$ 时，能使胸腺重量增加到 $42.23 \pm 4.79 \text{ mg}$ (对照组为 $32.55 \pm 8.76 \text{ mg}$) ($P < 0.05$)，白血球总数有非常显著的上升 ($P < 0.001$)。小鼠腹腔注射N-CWS $200 \mu\text{g}/\text{只}$ ，试验后说明有明显提高腹腔巨噬细胞的抗肿瘤活性 ($P < 0.05$)。

(2) 通过实验动物Lewis瘤、黑色素瘤、艾氏腹水瘤和S180的抑瘤或免疫治疗试验表明：N-CWS有显著抑制动物肿瘤生长和延长生存期的效果。

(3) N-CWS具有很低的毒性：小白鼠皮下注射LD50小于 $500 \text{ mg}/\text{kg}$ ，腹腔注射LD50为 $373 \text{ mg}/\text{kg}$ 。大白鼠皮内注射LD50小于 $14 \text{ mg}/\text{kg}$ 。狗皮下注射N-CWS $400 \mu\text{g}/\text{只}$ ，其呼吸、血压、心率和EBG均在正常范围内。大白鼠长期毒性试验，皮内注射N-CWS $400 \mu\text{g}/\text{只}$ 、 $286 \mu\text{g}/\text{只}$ 和 $200 \mu\text{g}/\text{只}$ ，给药6个月，其生长、体重、食欲、心电图、心率、外周血象、肝、肾功能检测均无影响。其实质性脏器光镜组织学检查，未见明显的病理变化。

实施例 1:

按本发明上述的培养基配方分别取: 葡萄糖 0.5%、酵母膏 1% 制成总体积为 2500 ml 的培养液 (A), 葡萄糖 2%、酵母膏 0.5% 制成总体积为 2500 ml 的培养液 (B), 葡萄糖 0.5%、酵母膏 2% 制成总体积为 3000 ml 的培养液 (C), 葡萄糖 1%、酵母膏 1% 制成总体积为 3000 ml 的培养液 (D), 葡萄糖 1.5%、酵母膏 0.5% 制成总体积为 3000 ml 的培养液 (E), 并分别按本发明上述技术方案进行培养、破碎处理、蛋白酶处理、溶媒提取, 真空干燥处理, 其各步得率量见表 1 所记载的内容。

(表 1)

培养液 编 号	培 养 液 量 (ml)	湿细胞量		N-CWS 粉 (g)	收 率 g/100mg (湿细胞)
			g/100ml		
A	2500	45	1.80	1.45	3.20
B	2500	42	1.70	1.80	4.28
C	3000	68	2.26	1.90	2.79
D	3000	60	2.00	1.80	3.00
E	3000	76	2.50	2.20	2.90
平 均 X±S			2.052 ±0.33		3.234 ±0.603